First Hit Previous Doc Next Doc Go to Doc#

☐ Generate Collection Print

L9: Entry 25 of 32 File: JPAB Jan 25, 2000

PUB-NO: JP02000026272A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 2000026272 A
TITLE: EXTRACTION OF BOTANICAL ACTIVE COMPONENT FROM SEED OF SWEET WHITE LUPIN AND COMPOSITION USING EXTRACTED SOLUTION OBTAINED OR AT LEAST PART OF THE SAME

PUBN-DATE: January 25, 2000

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
PAUFIQUE JEAN JACQUES	

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
SOC INDUSTRIELLE LIMOUSINE D'APPL BIOLOGIQUE	

APPL-NO: JP11133790
APPL-DATE: May 14, 1999

PRIORITY-DATA: 1998FR-06332 (May 14, 1998)

INT-CL (IPC): A61 K 7/48; A61 K 7/00; A23 N 1/00

ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a botanical active component regenerating a protective effect of skin on a harmful action from an environment by dissolving a powder obtained by pulverizing a seed of a sweet white lupine in an aqueous solution, hydrolyzing a protein in the presence of a protease, filtering the solution and distilling a filtrate.

SOLUTION: A powder obtained by pulverizing a seed of a sweet white lupin is dissolved in an aqueous solution in 5-20 vol.% concentration and a protein is hydrolyzed in the presence of a protease preferably at pH 6.0-9.0 at 50-80°C and the solution is filtered to give a transparent solution without a particle. Then the solution is sterilely filtered through a membrane in order to limit the presence of microorganisms, yeast, fungi and mesophilic floras and a botanical active component is extracted. The extracted solution obtained has a ≥20 g/l drying ratio, pH 2-10, ≥10 g/l protein ratio, 3 g/l total sugar ratio and shows a main peak of molecular weight based on various molecular species at 1300 Dalton. A molecule filtering test by a fast protein liquid chromatography is preferably continued.

COPYRIGHT: (C)2000,JPO

Previous Doc Next Doc Go to Doc#

(19)日本国特許庁（ＪＰ）

(12) **公開特許公報**（Ａ）

(11)特許出願公開番号
特開2000－26272
（P2000－26272A）

(43)公開日　平成12年１月25日(2000.1.25)

(51)Int.Cl.⁷		識別記号	ＦＩ		テーマコード(参考)
Ａ６１Ｋ	7/48		Ａ６１Ｋ	7/48	
	7/00			7/00	Ｋ
// Ａ２３Ｎ	1/00		Ａ２３Ｎ	1/00	

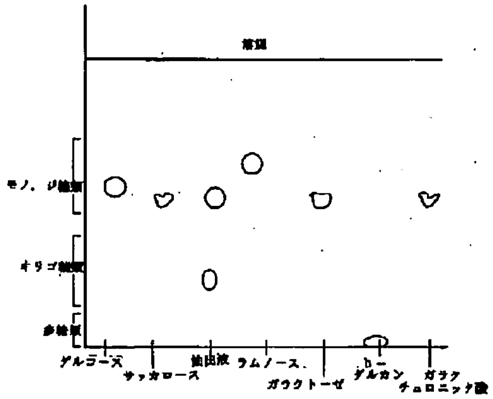
審査請求　未請求　請求項の数１　ＯＬ　外国語出願　（全 24 頁）

(21)出願番号　特願平11－133790
(22)出願日　平成11年５月14日(1999.5.14)
(31)優先権主張番号　９８／０６３３２
(32)優先日　平成10年５月14日(1998.5.14)
(33)優先権主張国　フランス（ＦＲ）

(71)出願人　599066090
ソシエテ．インダストリエレ．リムジン．ダプリカシオン．バイオロジック
フランス国．オブジャ．マドリアス．（番地なし）
(72)発明者　シャン－ジュック．パウフィック
フランス国．オブジャ．マドリアス．（番地なし）
(74)代理人　100073900
弁理士　押田　良久

(54)【発明の名称】　甘い白色ルピンの種子から植物活性成分を抽出する方法、得られた抽出液および該抽出液の少なくとも一部分を用いる組成物

(57)【要約】
【課題】　本発明は環境が皮膚に及ぼす有害な作用を低減するために、角層の厚みを増加するように活性成分を抽出する方法である。
【解決手段】　本発明は、
－甘い白色ルピンの種子を粉砕し粉末を得る工程と、
－得られた粉末を水性溶液中で濃度５～２０容量％に溶解する工程と、
－プロテアーゼの存在下に蛋白質を加水分解する工程と、
－溶液を沪過して、粒子のない透明な溶液を得る工程と、
－微生物、酵母、かびならびに全部の中温性フロラを保持するように沪液を蒸留する工程と、
からなることを特徴とする。本発明はまた、上記方法により得られた抽出液、該抽出液を含む組成物およびこれらを組合わせた処理方法を含むものである。



【特許請求の範囲】

【請求項１】　環境が皮膚に及ぼす有害な作用を低減するために、角層の厚みを増加するように活性成分を抽出する方法において、

－甘い白色ルピンの種子を粉砕し粉末を得る工程と、

－得られた粉末を水性溶液中で濃度５～２０容量％に溶解する工程と、

－プロテアーゼの存在下に蛋白質を加水分解する工程と、

－溶液を沪過して粒子のない透明な溶液を得る工程と、

－微生物、酵母、かびならびに全部の中温性フロラを保持するように沪液を蒸留する工程と、からなることを特徴とする植物活性成分を抽出する方法。

【請求項２】　前記加水分解の条件としてｐＨを６．０～９．０の範囲に保つことを特徴とする請求項１記載の植物活性成分を抽出する方法。

【請求項３】　前記加水分解の条件として温度を５０～８０℃の範囲に保つことを特徴とする請求項１または２記載の植物活性成分を抽出する方法。

【請求項４】　前記溶液は蒸留沪過以前に濃縮されることを特徴とする請求項１～３のいずれか１項記載の植物活性成分を抽出する方法。

【請求項５】　最終溶液を凍結乾燥することを特徴とする請求項４記載の植物活性成分を抽出する方法。

【請求項６】　環境が皮膚に及ぼす有害な作用を低減する目的で、角層の厚みを増加するため請求項１～５のいずれか１項記載の抽出方法によって得られた抽出液であって、

－乾燥物の比が２０ｇ／ｌ以上、好ましくは２０～２００ｇ／ｌ、特に好ましくは４０～６０ｇ／ｌであり、

－ｐＨが２～１０で、好ましくは５～９、特に好ましくは６．５～７．５であり、

－蛋白質の比が１０ｇ／ｌ以上、好ましくは１０～１００ｇ／ｌ、特に好ましくは２０～４０ｇ／ｌであり、

－全糖分の比が３ｇ／ｌ以上、好ましくは３～１００ｇ／ｌ、特に好ましくは５～２０ｇ／ｌであり、

－異なる分子種の分子量が１３００ダルトンに主なピークを示し、つぎにファースト蛋白液体クロマトグラフィーによる分子沪過試験が続く、ことを特徴とする抽出液。

【請求項７】　単糖が本質的にグルコースまたはサッカロースであることを特徴とする請求項６記載の抽出液。

【請求項８】　多糖またはオリゴ糖類が全糖類部分の３０％を占めることを特徴とする請求項６または７記載の抽出液。

【請求項９】　環境が皮膚に及ぼす有害な作用を低減する目的で、角層の厚みを増加するための化粧品組成物であって、請求項６、７または８記載の抽出液の一部分以上を含むことを特徴とする化粧品組成物。

【請求項１０】　角層の厚みを増加するために皮膚を処理する方法において、請求項９記載の化粧品組成物を皮膚に適用することを特徴とする皮膚を処理する方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】本発明は、甘い白色ルピン（ｗｈｉｔｅ　ｌｕｐｉｎ）の種子から植物活性成分を抽出する方法、得られた抽出液および該抽出液のうち少なくとも一部分を用いる組成物に関するものである。

【０００２】

【従来の技術】ルピンの種子はよく知られた産物で、特に動物飼料として栽培されているが、少くとも特に有害な物質の物質であるルピニンは除かれる。本発明に使用される品種は、特に甘い白色ルピンの種子である。この甘い白色ルピンの種子の定義は、本明細書の残部において、アルカロイドを含まない全種類のルピンを含むものである。

【０００３】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、環境の有害な作用に対する皮膚の保護作用を再生する抽出液を提供することである。この理由によりこの抽出液は、皮膚への日照の作用（ｅｆｆｅｃｔ）の低減を間接的に助けるものである。この抽出液は実用的には、例えば化粧品、クリーム、軟膏、粉末、溶液などと組合せることができる。

【０００４】角層（ｓｔｒａｔｕｍ　ｃｏｒｎｅｕｍ）を厚くすることは、微生物における主な防御手段の１つであり、また環境に対する皮膚の防御機能の再生の手段である。この防御法の反応時間は比較的遅く、皮膚の肥厚が効果的な保護を生じるまでに数日を要する。したがって防御的手段として表皮を保護することが必要である。本発明の目的は、表皮の保護、厚みの増加に有利な抽出液の提供を目的としている。この抽出液は、特に日照を受けた軽い皮膚を持つ人々に有利であることが判明した。

【０００５】このケラチン化（ｋｅｒａｔｉｎｉｓａｔｉｏｎ）反応は、良く知られた複雑な皮膚の反応を刺激し、結果から明らかなように肥厚による表皮構造の補強効果を支持する。この反応は皮膚の組織の、複雑な成熟法としてよく知られている。これによって、ケラチノサイテス（ｋｅｒａｔｉｎｏｃｙｔｅｓ）は、死んだ、角質化された細胞に変形する。この細胞は、水分の損失および有害な外部条件に対する保護に特に有益である。

【０００６】コルネオサイテス（ｃｏｒｎｅｏｃｙｔｅｓ）は、絡み合う蛋白質からなる封筒形状をなしている。それは角層をなすケラチンの網状組織で囲まれている。蛋白質は凝固して角層、特にインヴォルクリン（ｉｎｖｏｌｕｃｒｉｎ）を生じる。

【０００７】－インヴォルクリン：エッカルトの報告（Ｅｃｋｅｒｔ　Ｒ．Ｌ．　Ｍ．Ｂ．Ｃｒｉｆｈ　Ｊ．Ｆ．－Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉ ｖｅＤｅｒｍａｔｏｌｏｇｙ，１９９３，Ｖｏｌ．５，ｐ．６１３〜６１７）によると、この蛋白は、グルタミンを含む残基に富み（４０％グルタミンおよびグルタミン酸）、その結果目的とされた封筒形状に重要な役目を果たしている。封筒形状は、遅く進行し、インヴォルクリンはこの方法を初め、かつ目的への展開を促進する。封筒形状は、架橋された蛋白質（ｅ−（ｇ−グルタイル）リシン）の網状組織の発展と連動している。これは封筒の分子を組立てる構造を作り、全体の構造に安定性を与える。

【０００８】−フィラググリン（ｆｉｌａｇｇｒｉｎ）：この細胞蛋白質は、表皮の粒状層の中に合成され、燐酸化された先駆物質の形をなし、ケラチンフィラメントを集合させる能力を有する。さらにこの蛋白質は、代謝能を有し、ある文献（ＷｅｉｄｅｎｔｈａｌｅｒＢ．Ｈａｕｂｅｒ　Ｉ．，Ａｎｔｏｎ−Ｌａｎｐｒｅｃｈｔ　Ｉ．：Ｄｅｒｍａｔｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２８５，ｐ．１１１〜１２０）によると、角層の物性を維持するのに役立つ。この蛋白質の有効寿命は比較的短く、角層の更新速度は早いが、その減少は日照、その他の有害な要素に対する保護に役立つ。蛋白質分解は実際に早く、自由なアミノ酸の濃縮された集団を蛋白質分解する。この集団は紫外線に対するスクリーンとしておよび／またはＰＣＡ（ピロリドン・カルボン酸）のような水容器として重要である。

【０００９】本発明の方法により、これらの２つの構造的蛋白質の合成を特に刺激する活性成分を抽出することができる。この活性成分は、これらの２つの構造的蛋白質の合成を促進する。その結果合理的な日照時間を制限することにより、皮膚を保護できるので、日照の危険を避けることができる。

【００１０】本発明の方法により、前の成分と異なる性質および効果を有する活性成分を抽出することができる。これは、得られた抽出液が保護的効果を有する他に、角層の修復を助け、さらに水分損失を助ける表皮の脂質の代謝（ｌｉｐｉｄ　ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ）を助ける作用を有する理由である。

【００１１】

【課題を解決するための手段】この目的のために本発明の方法は、有害な外部の要素から皮膚を保護するために、角層の厚みを増加するように活性成分の厚みを増加するための、活性成分抽出法に関する。この方法は、

−甘い白色ルピンを研磨して粉末を得る工程と、
−こうして得られた粉を水性溶液中で濃度５〜２０容量％に溶解する工程と、
−プロテアーゼの存在下に蛋白質を加水分解する工程と、
−溶液を沪過して、粒子のない透明な溶液を得る工程と、
−微生物、酵母、かび、ならびに全部の中温性フロラ（ｍｅｓｏｐｈｉｌｉｃｆｌｏｒａ）を保持するように溶液を殺菌する工程と、

からなるものである。

【００１２】更に詳しくは加水分解条件は、ｐＨを６．０〜９．０とし、温度を５０〜８０℃とする。この方法により、溶液を滅菌沪過以前に濃縮でき、また最後の溶液を凍結乾燥することができる。

【００１３】こうして得られた抽出液も本発明の範囲に属し、角層の厚みを増し、皮膚の環境の有害な作用を低減することを目的とする。この抽出液は、

−乾燥物比率が２０ｇ／ｌ以上、好ましくは２０〜２００ｇ／ｌ、特に好ましくは４０〜６０ｇ／ｌであり、
−ｐＨが２〜１０、好ましくは５〜９、特に好ましくは６．５〜７．５であり、
−蛋白質比が、１０ｇ／ｌ以上、好ましくは１０〜１００ｇ／ｌ、特に好ましくは２０〜４０ｇ／ｌであり、
−全糖比が３ｇ／ｌ以上、好ましくは３〜１００ｇ／ｌ、特に好ましくは２０〜４０ｇ／ｌであり、
−異なる分子種の分子量が１３００ダルトンにピークを示し、ついでファースト蛋白（Ｆａｓｔ　Ｐｒｏｔｅｉｎ）液体クロマトグラフィー（Ｆ・Ｐ・Ｌ・Ｃ）による分子沪過試験が続く、

ことを特徴とするものである。そして単糖は本質的にグルコースおよびサッカロースで、多糖またはオリゴ糖類の比率は全糖類部分中３０％を占める。

【００１４】本発明の他の目的は、上記の抽出液の一部分以上を含む化粧品組成物の提供であって、角層の厚みを増加し、皮膚に及ぼす環境の有害な作用をなくすことができる。

【００１５】本発明のさらに他の目的は、角層の厚みを増加することのできる皮膚の処理法である。前記化粧品組成物を皮膚に与えると、角層の厚みを増加することができる。

【００１６】

【発明の実施の形態】本発明による抽出法はつぎの通りである。この説明は、抽出液に含まれる活性物質の具体的効果を示す効果も含んでいる。ルピンの種子を調製し粉砕して、純粋なルピン粉末を得る。この粉末は濃度５〜２０容量％まで水性溶液に溶解される。この溶液の溶解性を改善するために、温度を調節してもよい。

【００１７】つぎに蛋白質を加水分解する。特にｐＨ６．０〜９．０、温度５０〜８０℃とする。加水分解された溶液は、粉状粒子を除き、きれいな溶液を得るために沪過される。

【００１８】つぎに溶液を濃縮する。活性を強化するために必要なら、溶液を沪過する。脱水または凍結乾燥することもできる。

【００１９】最後に、微生物、全中温フロラ、酵母およびかびの存在を制限するために膜上で滅菌沪過する。

【００２０】得られた抽出液の特徴はつぎの通りであ

る。

（１）乾燥物の比が、２０ｇ／ｌ以上、好ましくは２０～２００ｇ／ｌ、特に好ましくは４０～６０ｇ／ｌである。この比は、重量一定になるまでオーブンで加熱して得らた。

（２）ｐＨが２～１０、好ましくは５～９、特に好ましくは６５．～７．５である。この値は電位差計で得られた。

（３）蛋白質の比が１０ｇ／ｌ以上、好ましくは１０～１００ｇ／ｌ、特に好ましくは２０～４０ｇ／ｌである。この値はＢｕｒｅｔ法で得られた。

（４）全糖分の比が３ｇ／ｌ、好ましくは３～１００ｇ／ｌ、特に好ましくは５～２０ｇ／ｌである。この比率は１９５６　ＤＵＢＯＩＳ法（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２９、Ｎｏ．３、ｐ．３５～３５６）で得られた。

単糖は本質的にグルコースおよびサッカロースである。全糖分中の多糖またはオリゴ糖の比は全糖分の３０％である。

【００２１】解糖された（ｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｅｄ）鎖の長さを決定することは有益である。使用できる方法はこの抽出液のシリカゲル上の薄膜クロマトグラフィーで、この抽出液を対照液と比較する：

ガラクトーゼ
グルコース
サッカロース
ガラクチュロニック酸
ｂ－グルカン
ラムノース

【００２２】移行溶媒（ｍｉｇｒａｔｉｏｎ　ｓｏｌｖｅｎｔ）はブタノール＋酢酸＋浸透した水である。展開する溶液は、オルシノール＋硫酸からなる。結果を図１に示す。抽出液はオリゴ糖類、モノおよびジ糖類の存在を示す。

【００２３】（５）アミノ酸の組成

つぎの１００ｇ当たりの数値は、主なアミノ酸の濃度を示す。

アスパラギン酸	５ｇ、
スレオニン	２ｇ、
セリン	３ｇ、
グルタミン酸	１０ｇ、
アラニン	２ｇ、
ロイシン	４ｇ、
アルギニン	５ｇ

【００２４】（６）異なる分子種からの分子量。

図２はＦ・Ｐ・Ｌ・Ｃ分子沪過試験の結果で、主なピークは１３００ダルトンである。得られた抽出液の特徴により、具体的な効果を実証することができる。

【００２５】（Ｉ）脂質の代謝に対する得られた抽出液の効果。

下記する動作説明は、本発明による抽出液で処理された皮膚の外植体（ｅｘｐｌａｎｔｓ）を培養することからなり、該皮膚の外植体は増殖培地中に置かれた生きた微生物から取られた断片である。抽出液は水性溶液の形で、その濃度は２容量％であった。これを５％のＣＯ$_2$雰囲気で３７℃で４８時間培養した。４８時間培養後、真皮（ｄｅｒｍｉｓ）と表皮（ｅｐｉｄｅｒｍｉｓ）とを分離した。表皮の種々の種類および性質を薄膜クロマトグラフィーで区別した。下記する表１は、脂質の型を示す。

【００２６】

【表１】

	対照	2％抽出液
極性脂質（ｐｏｌａｒ　ｌｉｐｉｄｓ）	１００	７９
セラミド（ｃｅｒａｍｉｄｅｓ）	１００	１６６
コレステロール	１００	１３４
ジおよびトリグリセリド	１００	１２０
セレボロシド（ｃｅｒｅｂｒｏｓｉｄｅｓ）	１００	１３６
硫酸塩コレステロール	１００	１１４

【００２７】２％抽出液の濃縮の結果から特に顕著な増加が認められた。

－セラミド（＋７０％）
－コレストロール（＋３０％）
－ジおよびトリグリセリド（＋２０％）

【００２８】（ＩＩ）角層の修復可能性。

この試験は、２％乳酸を用いた化学的施行後に行われた。その結果を図３に示す。線１は乳酸で処理し、つぎに本発明の方法で得た抽出液で４８時間処理した後の厚みである。９０μｍへの復帰が認められたが満足であった。線２は、本発明の方法で得た抽出液で４８時間保存処理した時の厚みを示す。この保存処理後、乳酸処理したところ、乳酸の効果に拘らず厚みは少なくとも対照品の厚みに等しかった。線３は、乳酸処理後の厚みで、６０μｍへの減少が見られた。線４は、対照品の厚みで、８０μｍであった。

【００２９】（ＩＩＩ）表皮のケラチン化（ｋｅｒａｔｉｎｉｓａｔｉｏｎ）または角層の肥厚化。

再構成された表皮がＥｐｉｓｋｉｎ（商品名）で販売されていた。これは増殖培地で作られた人工表皮に類似であったので試験に用いた。細胞増殖相（ｃｅｌｌ　ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ　ｐｈａｓｅ）間に再構成され

た表皮を処理した。すなわち培地に５％抽出液を加えて、４８時間処理した。

【００３０】成育をブロックするために固定液を通過した後、対照表皮および処理済表皮は脱水され、樹脂に加えられ、極めて薄い切片に切られ、ヘマチン、エリスロシンおよびサフロンで３色に染められ、つぎに顕微鏡および写真で観察された。図４（Ａ）および図４（Ｂ）は、それぞれ対照表皮および処理済表皮を示す。

【００３１】表２は測定結果である。特に興味があるのは、厚みの３７％増加である。写真は表皮層および角層の肥大を示している。表の数値は暗示的で、縮尺を無視して写真から直接に測られた。

【００３２】

【表２】

	角層の厚み （μｍ）	増　加 （％）
対　照	８０	
構成２％	８０	
構成３％	９０	１２
構成４％	１００	２５
構成７％	１１０	３７

【００３３】（ＩＶ）水分損失。

皮膚の障壁の役割は、皮膚内の水分と何かの病変（それは知覚できない水分の損失と呼ばれる要素の増加を生じる何かの病変）との間のバランスを維持することである。この要素は、皮膚の周囲の水蒸気の圧力の勾配を測定することによって調べることができる。しかし知覚できない水分の損失は極めて小さいので、洗浄液、例えば１０％ソジウム・ラウリル・サルフェイトを与えることによって、この水分損失を増加させることができる。

【００３４】人体試験を行い、本発明の方法で得た７０％抽出液を含むクリームを１日２回投与した。結果を表３、表４および表５に示す。そこではＤ０（初日）とＤ１４（１４日経過後）のボランティア６名を用いた。

【００３５】

【表３】

ボランティア	Ｄ０	Ｄ１４
１	４．１	５．７
２	１１．９	２１．８
３	１１．３	１７．４
４	８．５	１４．６
５	８．３	１０．３
６	９．２	１２．４
平　均	８．９	１３．７
ＭＳＤ	１．０	２．１

【００３６】表３は未処理であるが、水洗した部分の平均値およびこの平均値の標準偏差値を示し、知覚できない水分の損失が時間とともに増加することを示している。

【００３７】

【表４】

ボランティア	Ｄ０	Ｄ１４
１	３．７	５．１
２	１５．６	１８．８
３	１９．１	１３．６
４	７．９	１２．４
５	６．８	８．１
６	１０．１	１１．５
平　均	１０．５	１１．６
ＭＳＤ	２．２	１．８

【００３８】表４は水洗し、抽出液を含むクリームで処理した部分の平均値およびこの平均値の標準偏差値を示す。

【００３９】

【表５】

ボランティア	Ｄ０	Ｄ１４
１	０．０	－０．９
２	０．０	－３４．２
３	０．０	－５３．８
４	０．０	－８．６
５	０．０	－４．０
６	０．０	－１５．５
平　均	０．０	－１９．５
ＭＳＤ	０．０	７．７

【００４０】表５は平均値およびこの平均値の標準偏差値までの変化を百分率で示す。抽出液の投与によって、角層の再構成および強化が可能となり、皮膚の脱水の積極的な規制と制御とが可能になった。

【００４１】（Ｖ）蛋白質合成。

蛋白質、特にフィラググリンのレベルを調べた。このためにメッセンジャーＲＮＡモニターを用いた。人のケラチノサイテスを、本発明による抽出液の存在下または参考分子の存在下に培養した。後者はケラチノサイテスの分化（ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ）を活性化する。ここでは塩化カルシウムであった。全部のｍＲＮＡは、抽出液の存在下に単離され、つぎにレバースートランスクリップターゼおよび補助的なＤＮＡを分析した。

【００４２】図５は本発明の抽出液が３．９の因数で示されるフィラグリンｍＲＮＡを増加させることを示す。ただし塩化ナトリウムは２．８において同じ因数を増加させる。表は結果の要約を示す。抽出液は蛋白質の合成を刺激する。

【００４３】本発明の方法で得られた抽出液は、多くの特徴を有するので便利である。実際に抽出液はオリゴ糖および低分子量のグルタミンを含有するペプチドに富むので、浸透性に富み、ケラチノサイテスの活性を高め、

フィラグリン型の構成蛋白質の合成を刺激する。結果として得られる角層の肥厚は水分損失を減じ、脱水を助け、日射により皮膚を乾燥させる。

【0044】

【発明の効果】上記の通り本発明により、活性成分を抽出することができる。この成分は特に上記の２つの構造的蛋白質の合成を促進する。つぎに予防的処理を可能にし、これによって合理的な日照の危険を制限するよう皮膚を整える。

【図面の簡単な説明】

【図１】離糖された鎖の特性を示す説明図である。

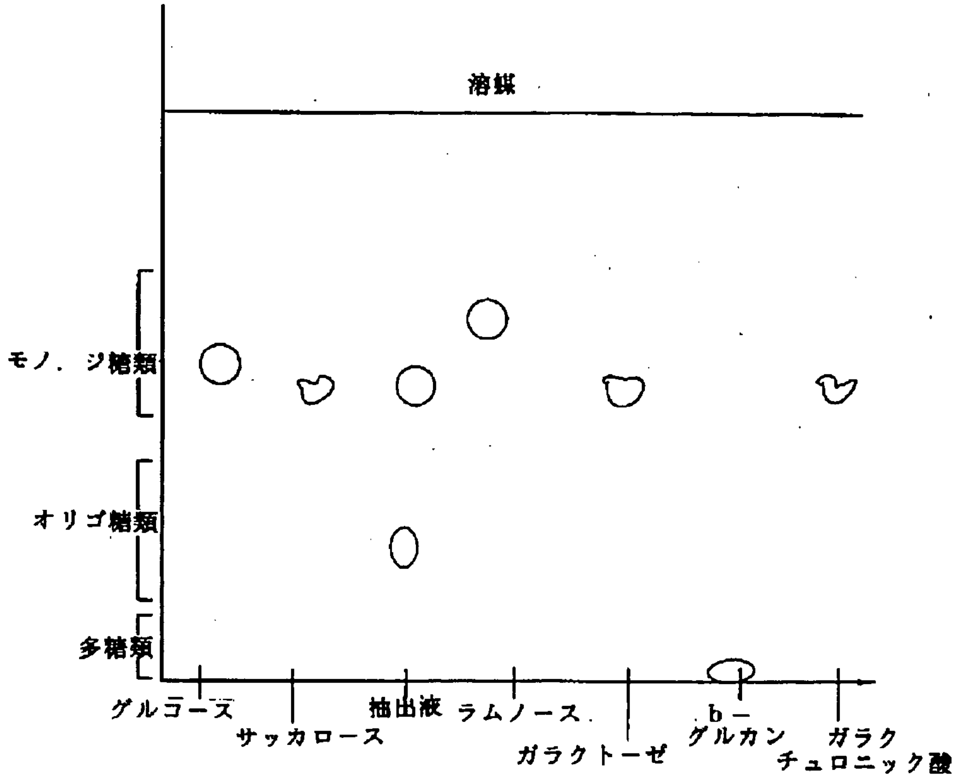
【図２】各種の分子種に対する試験のグラフである。

【図３】各種の修復可能性を示すグラフである。

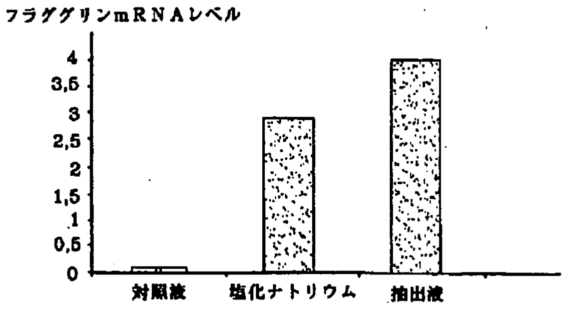
【図４】表皮の条件を示す図で、（Ａ）は対照の表皮を示す図、（Ｂ）は処理済の表皮を示す図である。

【図５】処理の関数としてのフィラググリンｍＲＮＡのグラフである。

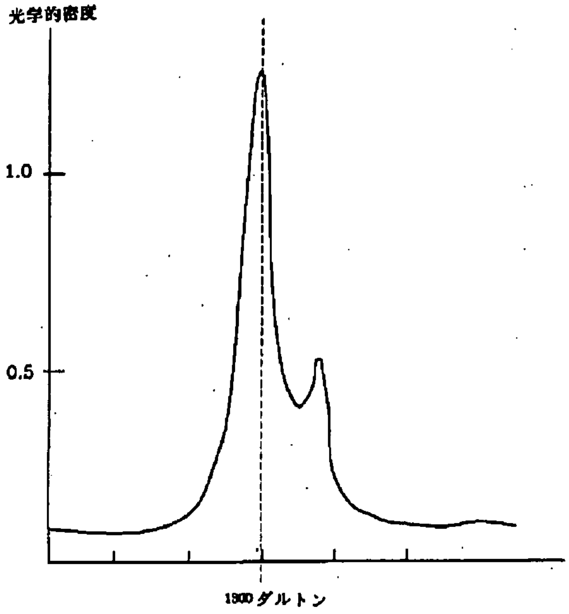
【図1】



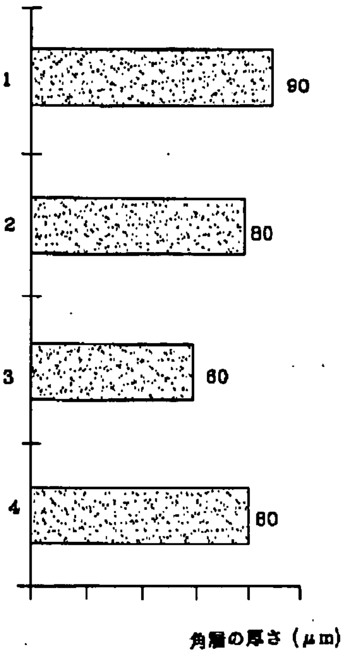
【図5】



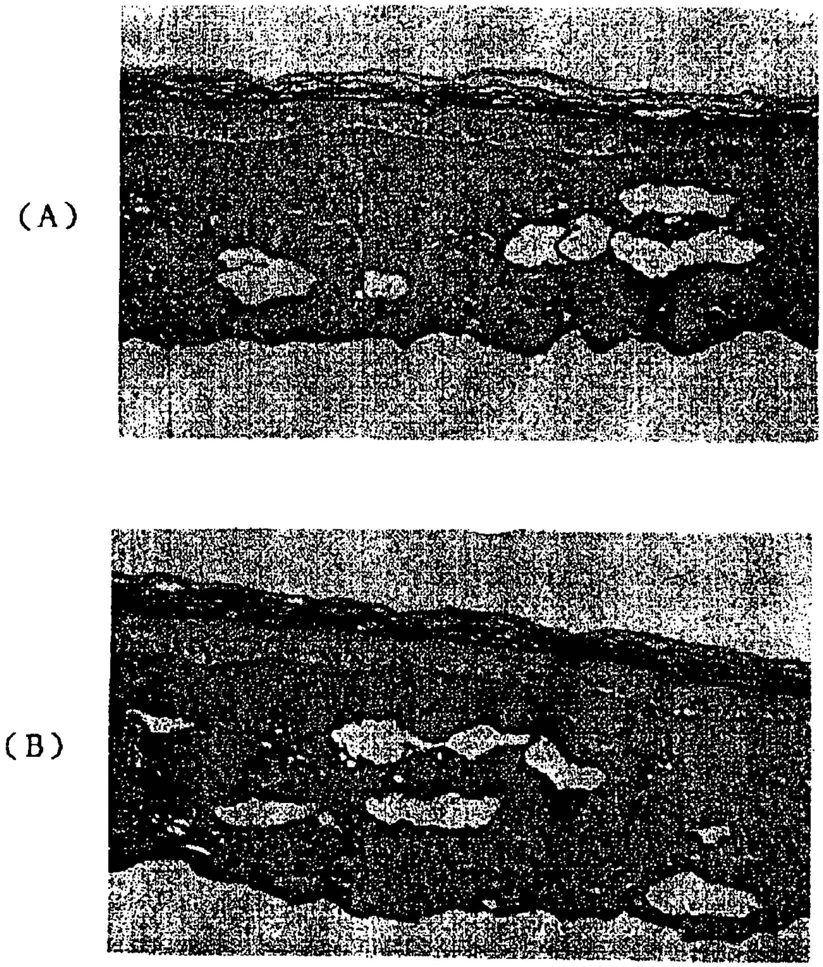
【図2】



【図3】



【図4】



【外国語明細書】

1. Title of the Invention

PROCEDURE FOR THE EXTRACTION OF PLANT ACTIVE INGREDIENTS FROM THE GRAINS OF SWEET WHITE LUPIN, EXTRACT OBTAINED AND COMPOSITION USING AT LEAST A FRACTION OF THIS EXTRACT

2. Claims

(1.) Procedure for the extraction of active ingredients intended to increase the thickness of the *stratum corneum* in order to combat the detrimental effects of the environment on the skin, wherein it is comprised of the following series of steps :

- grinding of sweet white lupin grains to obtain a flour.
- dissolving the flour obtained in this way to a concentration of 5 to 20% volume in aqueous solution,
- hydrolysing proteins in the presence of a protease,
- filtering the solution such that a clear solution free of particles is obtained,
- sterilising filtration to retain micro-organisms, yeasts and moulds as well as total mesophilic flora.

(2.) Extraction procedure according to claim 1 wherein hydrolysis conditions are such that pH is maintained between 6.0 and 9.0.

(3.) Extraction procedure according to claim 1 or 2 wherein hydrolysis conditions are such that temperature is maintained between 50℃ and 80℃.

(4.) Extraction procedure according to any one of the preceding claims wherein the solution is concentrated prior to sterilising filtration.

(5.) Extraction procedure according to claim 4 wherein the final solution is freeze-dried.

(6.) Extract obtained by the procedure according to any one of the receding claims intended to increase the thickness of the *stratum corneum* in order to combat the detrimental effects of the environment on the skin, wherein it has the following characteristics :

- dry matter ratio greater than 20 g/l, notably between 20 and 200 g/l, more particularly between 40 and 60 g/l,
- pH between 2 and 10, notably between 5 and 9, more particularly between 6.5 and 7.5,

- protein ratio greater than 10 g/l, notably between 10 and 100 g/l, more particularly between 20 and 40 g/l,
- total sugar ratio greater than 3 g/l, notably between 3 and 100 g/l, more particularly between 5 and 20 g/l,
- molecular weight of different molecular species presenting a principal peak at 1300 Daltons following a molecular filtration test by Fast Protein Liquid Chromatography (F.P.L.C.).

(7.) Extract according to claim 6 wherein the simple sugars are essentially glucose and saccharose.

(8.) Extract according to claim 6 or 7 wherein the complex sugars or oligosaccharides are present in a proportion of 30% in the total sugar fraction.

(9.) Cosmetic composition to increase the thickness of the *stratum corneum* in order to combat the detrimental effects of the environment on the skin wherein it contains at least a part of the extract according to claims 6, 7 or 8.

(10.) Procedure for the treatment of skin in order to increase the thickness of the *stratum corneum* wherein a cosmetic composition according to claim 9 is applied to the skin.

3.Detailed Description of the Invention

This invention concerns a procedure for the extraction of plant active ingredients from the grains of sweet white lupin, extract obtained and composition using at least a fraction of this extract.

Lupin grain is a well-known product and cultivated in particular for animal feed but only from those varieties devoid of lupinin, a particulariy toxic substance.

The variety used in this invention is more particularly the grain of sweet white lupin. This definition of sweet white lupin should be regarded as including all species of lupin devoid of alkaloids for the remainder of this description.

The objective of this invention is to propose an extract which regenerates the barrier role of the skin against the detrimental effects of the environment.

For this reason, this extract indirectly helps combat the effect of sun rays on the skin.

This extract can be combined with cosmetic agents, creams, ointments, powders and solutions, for example, for practical use.

One of the principal means of defence in an organism and of regeneration of the barrier function of the skin against environmental damage is a thickening of the *stratum corneum.*

This defence process has a relatively slow response time and thickening of the skin takes several days to provide effective protection.

It is therefore necessary to protect the epidermis in a preventive manner. This invention is aimed at proposing an extract which leads to a protective increase in the thickness of the *stratum corneum* as it is found that this is a particularly effective process, especially for people with light skin exposed to sunshine.

This extract stimulates the keratinisation reaction, as will be shown by the results obtained, supporting the reinforcing effect of the epidermal armature by thickening.

This keratinisation reaction is a well-established and complex maturation process of the cutaneous tissue by means of which living keratinocytes are transformed into dead cornified cells which are particularly effective as protection against water loss and harmful external conditions.

The corneocytes occur in the form of envelopes consisting of intertwining proteins surrounded by a network of keratin filaments which together constitute the *stratum corneum.*

Proteins give the stratum corneum its cohesion, and in particular :

- involucrin : this protein described by ECKERT R.L. YAFFE M.B, CRISH J.F (Journal of Investigative Dermatology, 1993, Vol. 5, p. 613-617) is rich in glutamine-containing residues (40% glutamine and glutamic acid) and because of this plays an important role in the formation of envelopes.

Envelope formation is a slow process and involucrin initiates the process and stimulates its progression, the objective sought.

The envelope formation process is linked to development of a network of bridged proteins (e-(g -glutayl)lysine) which makes up the structure of the envelopes' molecular framework and gives the whole structure its stability, and

- filaggrin : this cell protein is synthesised in the granular layer of the epidermis in the form of a phosphorylated precursor and has the capacity to aggregate keratin filaments.

Moreover, this protein has a metabolic role which helps maintain the physical properties of the *strotum corneum*, as described in the article by WEIDENTHALER B., HAUBER I., ANTON-LANPRECHT I. (Dermatological Research, 285, p. 111-120).

This protein has a relatively short lifespan given the rapid rate of renewal of the *stratum corneum* but its degradation still helps protect against sunshine and other harmful factors. It is actually proteolysed rapidly to generate a concentrated group of free amino acids which play an important role as a screen against UV and/or as a water reservoir, such as PCA (pyrrolidone carboxylic acid).

The procedure according to the invention makes it possible to extract the active ingredients which especially stimulate the synthesis of these two structural proteins. This then allows preventive treatments to be obtained to prepare the skin for the sun by limiting the risks of reasonable exposure to the sun.

The procedure according to this invention allows active ingredients to be extracted which have other characteristics and other effects which complement the previous ones.
This is why the extract obtained, in addition to a protective effect, also helps repair the *stratum corneum* and has an effect on the metabolism of epidermal lipids which help reduce water loss.

To this end, the procedure according to the invention concerns the extraction of active ingredients intended to increase the thickness of the *stratum corneum* in order to protect the skin against harmful external factors. It is characterised in that it consists of the following series of steps:

- grinding of sweet white lupin grains to obtain a flour.
- dissolving the flour obtained in this way to a concentration of 5 to 20% volume in aqueous solution,
- hydrotysing proteins in the presence of a protease,
- filtering the solution such that a clear solution free of

particles is obtained,

- sterilising filtration to retain micro-organisms, yeasts and moulds as well as total mesophilic flora.

More particularly, hydrolysis conditions are such that pH is maintained between 6.0 and 9.0 and the temperature is maintained at 50℃ to 80℃.

According to the procedure, the solution is concentrated prior to sterilising filtration and even the final solution can be freeze-dried.

The invention also covers the extract obtained, intended to increase the thickness of the *stratum corneum* in order to combat the detrimental effects of the environment on the skin. It has the following characteristics :

- dry matter ratio greater than 20 g/l, notably between 20 and 200 g/l, more particularly between 40 and 60 g/l,
- pH between 2 and 10, notably between 5 and 9, more particularly between 6.5 and 7.5,
- protein ratio greater than 10 g/l , notably between 10 and 100 g/l, more particularly between 20 and 40 g/l,
- total sugar ratio greater than 3 g/l, notably between 3 and 100 g/l, more particularly between 5 and 20 g/l,
- molecular weight of different molecular species presenting a principal peak at 1300 Daltons following a molecular filtration test by Fast Protein Liquid Chromatography (F.P.L.C.).

The simple sugars are essentially glucose and saccharose and complex sugars or oligosaccharides are present in a proportion of 30% in the total sugar fraction.

Another objective of the invention is a cosmetic composition which contains at least one part of said extract to increase the thickness of the stratum corneum in order to combat the detrimental effects of the environment on the skin.

Another objective of the invention is a procedure for the treatment of skin in order to increase the thickness of the stratum corneum characterised in that this cosmetic composition is applied to the skin.

The extraction procedure will now be described and includes the results of tests showing the concrete effects of the active ingredients present in the extract.

Lupin grains are prepared and ground to obtain a pure lupin flour. This flour is dissolved in an aqueous preparation to a concentration of 5 to 20% in volume. It is possible to adjust the temperature of this solution to obtain better solubility.

Proteins are then hydrolysed using a protease at a pH value between 6.0 and 9.0 at a temperature between 50℃ and 80℃ more particularly.

The hydrolysis solution is then filtered so as to remove flour particles and obtain a clear solution.

The solution is then concentrated if need be to reinforce activity. It can be dehydrated or freeze-dried.

The final stage of the procedure is sterilising filtration on a membrane in order to limit the presence of micro-organisms, total mesophilic flora, yeasts and moulds.

The extract obtained is characterised by the following data:

1 / dry matter ratio greater than 20 g/l, from 20 to 200 g/l, more particularly between 40 and 60 g/l,

This ratio is achieved by heating in the oven at 105℃ until a constant weight is obtained.

2/ pH between 2 and 10, notably between 5 and 9, more particularly between 6.5 and 7.5,

This value is obtained by the potentiometric method.

3/ protein ratio greater than 10 g/l, notably between 10 and 100 g/l, more particularly between 20 and 40 g/l,

This ratio is obtained by the Biuret method.

4/ total sugar ratio greater than 3 g/l, notably between 3 and 100 g/l, more particularly between 5 and 20 g/l,

This ratio is obtained using the 1956 DUBOIS method (Analytical Chemistry, 29, No. 3, p. 35-356).

The simple sugars are essentially glucose and saccharose.

The complex sugars or oligosaccharides are present in a proportion of 30% in the total sugar fraction.

It is useful to determine the length of glycosylated chains. The method used is thin layer chromatography on silica gel of this extract compared with control solutions :

- galactose,
- glucose,
- saccharose,
- galacturonic acid,
- b-glucan,
- rhamnose,

The migration solvent is a solution of butanol + acetic acid + osmosed water.

The developing solution consists of orcinol + sulphuric acid.

The results are given in Figure 1,

It is noted that the extract shows the presence of oligosaccharides, mono-and di-saccharides.

5/composition in amino acids

The following ratios per 100 g are given as an indication of the concentrations of each of the principal amino acids :

Aspartio Acid 5g
Threonine 2g
Serine 3g
Glutamic Acid 10g
Alanine 2 g
Leucine 4 g
Arginine 5 g

6/ molecular weight of different molecular species

The results of a F.P.L.C. molecular filtration test are given in Figure 2 and the graph obtained shows a main peak at 1300 Daltons.

After characterisation of the extract obtained, the concrete effects obtained will be demonstrated.

I/Effect of extract obtained on lipid metabolism

The operating protocol followed consists in cultivating skin explants (fragment taken from a living organism placed in growing medium) treated with the extract according to the invention.

Extract concentration is 2% in volume in the form of an aqueous solution.

Incubation for 48h at 37℃ under an atmosphere of 5% CO_2, After incubation for 48h, the dermis and epidermis are separated and different categories of epidermis and their quantities are identified by thin layer chromatography.

The lipid types are given in Table 1.

Table 1

	Control	2% Extract
Polar lipids	100	79
Ceramides	100	166
Cholesterol	100	134
Di and Triglycerides	100	120
Cerebrosides	100	136
Cholesterol Sulphate	100	114

A particularly marked increase can be seen from the results for the 2% extract concentration:

- ceramides (+ 70%),
- cholesterol (+ 30%),
- di and triglycerides (+ 20 %).

II/Stratum corneum repair potential

This test is carried out after chemical attack, in this case using 2% lactic acid for tests.

The results are given in Figure 3.

Line 1 represents thickness after attack by lactic acid followed by 48 hour treatment with the extract obtained by the procedure according to the invention. A return to a thickness of 90 μm is observed, which is satisfactory.

Line 2 represents thickness after 48 hour preventive treatment with the extract obtained by the procedure according to the invention. Thickness remains at least equal to the thickness of the control sample in spite of the effect of lactic acid after this preventive treatment.

Line 3 represents thickness after attack by lactic acid, which reduces thickness to 60 μm.

Line 4 represents the thickness of the control sample which is 80μm.

III/Keratinisation of the epidermis or thickening of the *stratum corneum*

Reconstituted epidermis sold under the trade name Episkin, which resembles human epidermis preserved in growing medium, was used for this test.

Treatment with the extract is carried out on reconstituted epidermis during the cell proliferation phase by adding 5% of extract to the culture medium for a period of 48 hours.

After passing through a fixing fluid to block growth, control epidermis and treated epidermis are dehydrated and added to a resin. Very thin slices are cut and dyed trichromatically with haematein, erythrosin and saffron then viewed under the microscope and photographed. Figures 4(A) and 4(B) show the control epidermis and treated epidermis respectively.

The results of measurements (in Table 2) show a 37% increase in thickness, a particularly interesting result. The photographs illustrate a thickening of the epidermal layers and the *stratum corneum*. The values in the table are imply comparative and were measured directly from photographs without taking into account scales.

Table 2

	Thickness of stratum corneum (μ)	% increase
Control	80	
STRUCTURIN 2%	80	
STRUCTURIN 3%	90	12%
STRUCTURIN 4%	100	25%
STRUCTURIN 7%	110	37%

IV/Water loss

The cutaneous barrier plays a role in maintaining the balance of water in the skin and any lesions which lead to greater water loss which increase the factor called imperceptible water loss (IWL).

This factor can be determined by measuring the pressure gradient of water vapour which surrounds the skin.

However, as IWL is very low, this loss of water can be increased by applying a detergent solution, in this case 10% Sodium Lauryl Sulphate.

Tests conducted on humans were carried out by twice-daily application of a cream containing 70% extract obtained by the procedure according to the invention.

The results given in the tables in Tables 3, 4 and 5 show the results from 6 volunteers between D0 and D14.

Table 3

Volunteers	DO	D14
1	4.1	5.7
2	11.9	21.8
3	11.3	17.4
4	8.5	14.6
5	8.3	10.3
6	9.2	12.4
Mean	8.9	13.7
MSD	1.0	2.1

Table 3 gives the mean and standard deviation for this mean on an untreated but washed area so that IWL increases with time, the intended effect.

Table 4

Volunteers	DO	D14
1	3.7	5.1
2	15.6	18.8
3	19.1	13.6
4	7.9	12.4
5	6.8	8.1
6	10.1	11.5
Mean	10.5	11.6
MSD	2.2	1.8

Table 4 shows the mean and standard deviation for this mean on a washed area and treated with the cream containing the extract.

Table 5

Volunteers	DO	D14
1	0.0	-0.9
2	0.0	-34.2
3	0.0	-53.8
4	0.0	-8.6
5	0.0	-4.0
6	0.0	-15.5
Mean	0.0	-19.5
MSD	0.0	7.7

Table 5 shows the changes in the percentage in the form of the mean and standard deviation of this mean.

It can be seen that application of the extract leads to restructuring and reinforcement of the *stratum corneum* which actively helps regulate and control cutaneous dehydration.

V/Protein synthesis

Protein levels were investigated, more particularly filaggrin levels. Messenger RNA monitoring was used to this end.

Human keratinocytes were incubated in the presence of the extract according to the invention or in the presence of a reference molecule which activates keratinocyte differentiation, calcium chloride in this case.

Total mRNA in the presence of extract was isolated then reverse-transcriptase and complementary DNA were analysed.

Fig. 5 shows that the extract according to the invention increases filaggrin mRNA expression by a factor of 3.9 whereas sodium chloride increases this same factor by 2.8. The table gives a summary of the results.

The extract stimulates the synthesis of proteins.

The extract obtained by the procedure according to the invention has many characteristics which make it beneficial.

In fact, its richness in oligosaccharides and low molecular weight glutamine-containing peptides allows for good penetration, triggers the activity of keratinocytes and stimulates the synthesis of structural proteins of the filaggrin type.

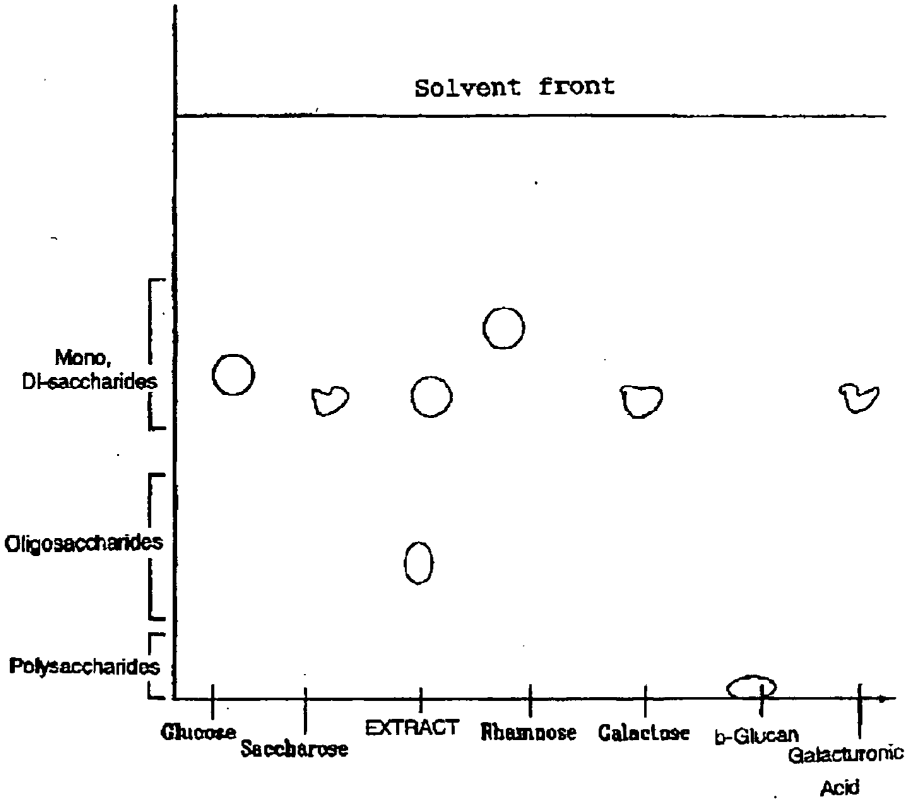
The resulting thickening of the *stratum corneum* moderates water losses and helps combat dehydration and drying out of the skin on exposure to the sun.

According to the invention as above mentioned, it makes possible to extract the active ingredients which especially stimulate the synthesis of these two structural proteins. This then allows preventive treatments to be obtained to prepare the skin for the sun by limiting the risks of reasonable exposure to the sun.

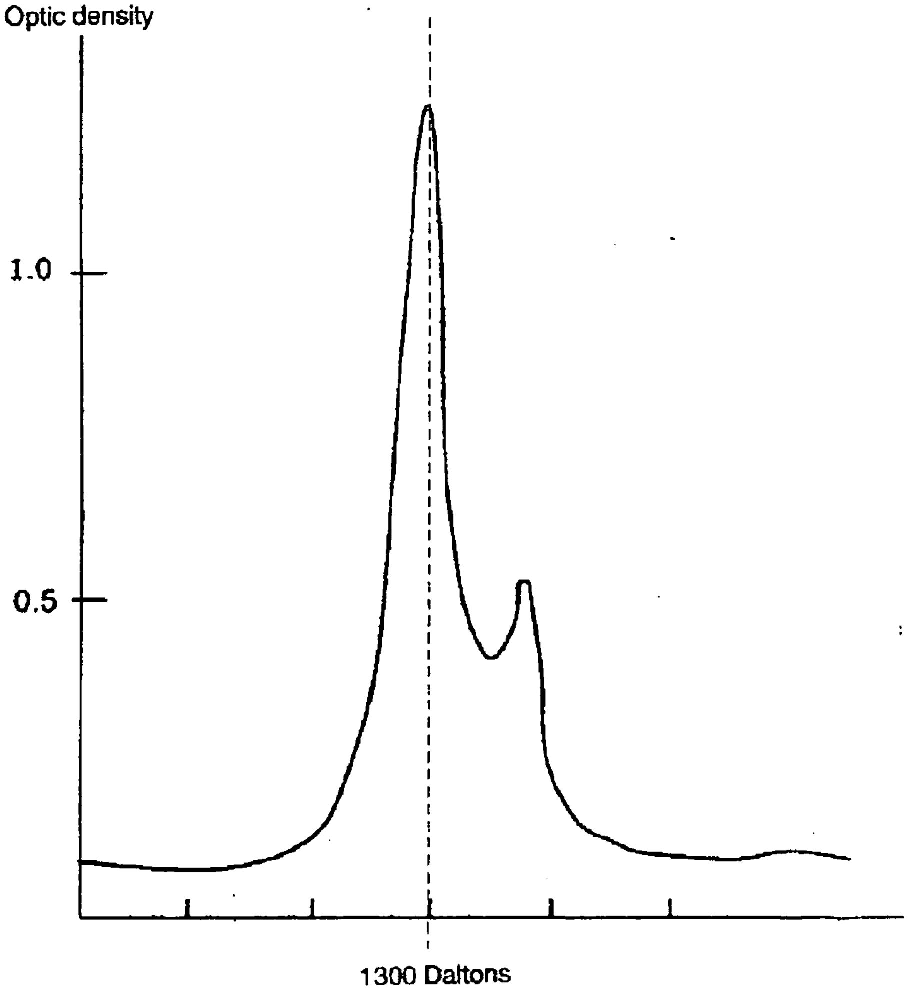
4. Brief Description of the Drawings

- Figure 1 is an illustration of the characterisation of glycosylated chains
- Figure 2 is a graph of tests for different molecular species
- Figure 3 is a graph of different repair potentials
- Figure 4 shows epidermis conditions; (A) and (B) represents the control and treated epidermis respectively
- Figure 5 is a graph of filaggrin mRNA levels as a function of treatments.

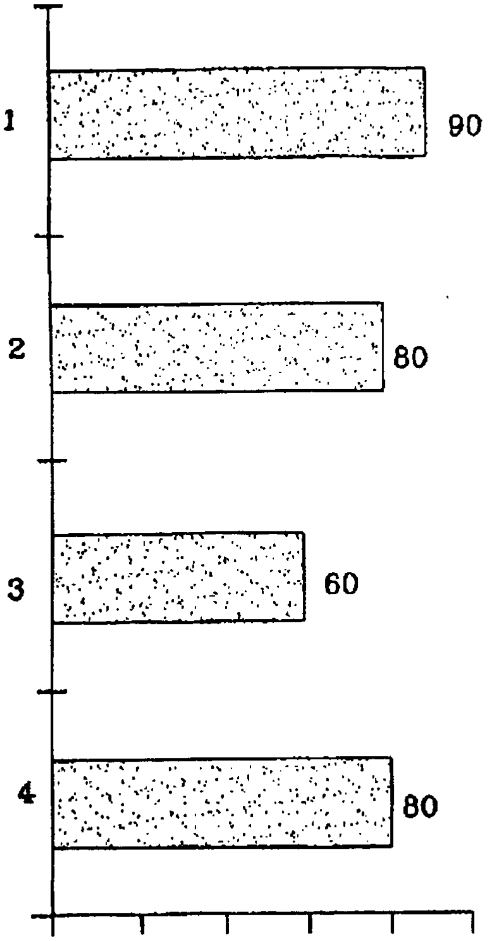
【図1】


Solvent front
Mono,
DI-saccharides
Oligosaccharides
Polysaccharides
Glucose
Saccharose
EXTRACT
Rhamnose
Galactose
b-Glucan
Galacturonic
Acid

【図２】

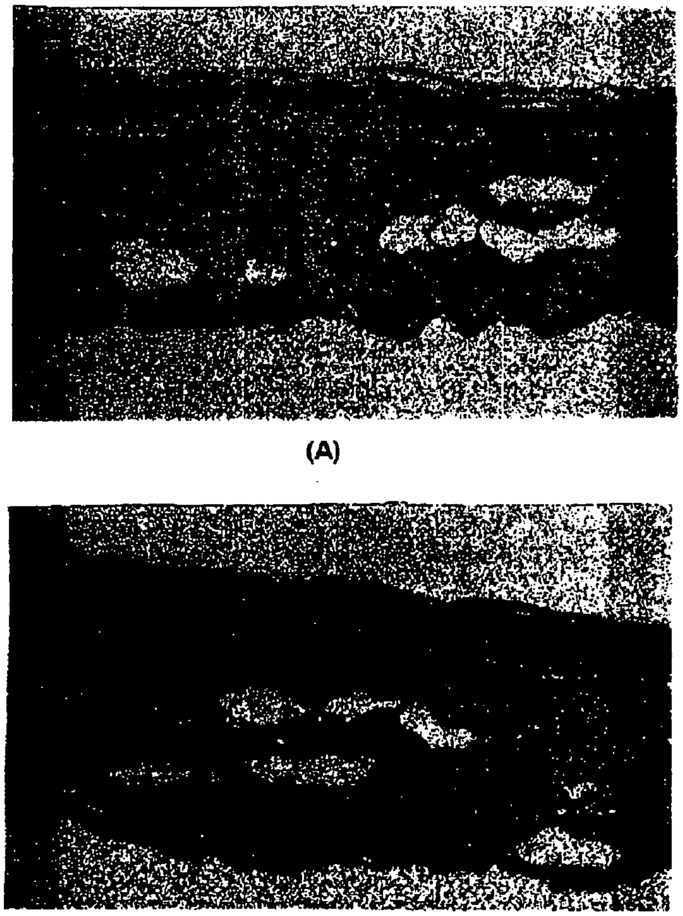


【図3】



Thickness of stratum corneum (μm)

【図1】

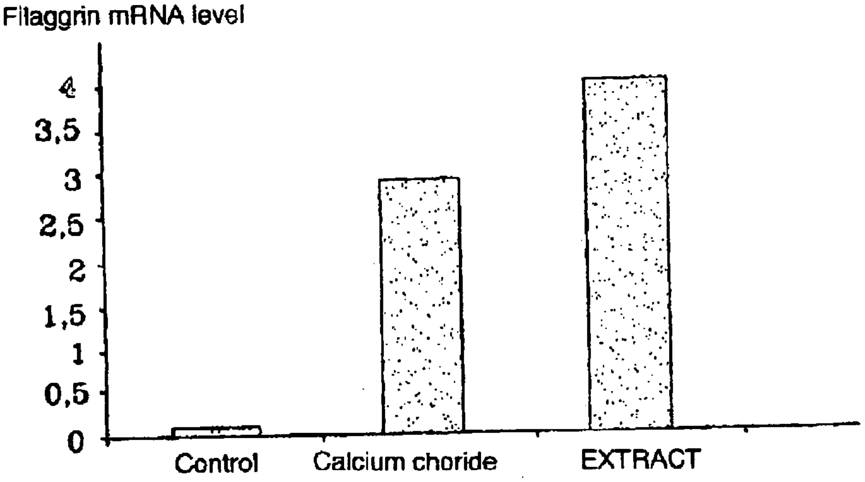


(A)

(B)

Best Available Copy

【図5】



1. Abstract

The invention is a procedure for extraction of active ingredients intended to increase the thickness of the *stratum corneum* in order to combat the detrimental effects of the environment on the skin, characterised in that it is comprised of the following series of steps :

- grinding of sweet white lupin grains to obtain a flour.
- dissolving the flour obtained in this way to a concentration of 5 to 20% volume in aqueous solution,
- hydrolysing proteins in the presence of a protease,
- filtering the solution such that a clear solution free of particles is obtained,
- sterilising filtration to retain micro-organisms, yeasts and moulds as well as total mesophilic flora.

The invention also covers the extract obtained by this procedure, the composition which contains it and the associated treatment procedure.

3. Representative Drawing

Figure 1